

日本国特許庁

05.10.99

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 22 NOV 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年 9月 2日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第248861号

出願人

Applicant(s):

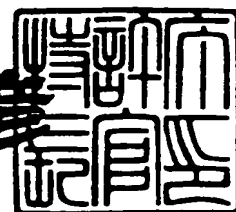
株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター

PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月 5日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3075739

特平 10-248861

【書類名】 特許願

【整理番号】 SEN-001

【提出日】 平成10年 9月 2日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明の名称】 蛋白質のリン酸化を測定するためのモニター蛋白質

【請求項の数】 10

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区湯島 1-5-45 東京医科歯科大学 難  
治疾患研究所内

【氏名】 萩原 正敏

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区大川 5-1 チッソ（株）横浜研  
究所内

【氏名】 井上 敏

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区湯島 1-5-45 東京医科歯科大学 難  
治疾患研究所内

【氏名】 永井 康雄

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都文京区湯島 1-5-45 東京医科歯科大学 難  
治疾患研究所内

【氏名又は名称】 萩原 正敏

【特許出願人】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区大川 5-1 チッソ（株）横浜研  
究所内

【氏名又は名称】 井上 敏

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都文京区湯島 1-5-45 東京医科歯科大学 難  
治疾患研究所内

【氏名又は名称】 永井 康雄

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛋白質のリン酸化を測定するためのモニター蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項1】 リン酸化を受けるアミノ酸残基またはアミノ酸配列を含むリン酸化領域と、該アミノ酸残基または該アミノ酸配列がリン酸化を受けることにより生じる少なくとも該リン酸化領域を含む蛋白質の立体構造変化に起因した特性変化を示す特性可変領域とを含む、蛋白質のリン酸化を測定するためのモニター蛋白質。

【請求項2】 特性可変領域が蛍光を発する蛋白質であることを特徴とする、請求項1記載のモニター蛋白質。

【請求項3】 特性可変領域がリン酸化領域の両側に結合していることを特徴とする、請求項1または2に記載のモニター蛋白質。

【請求項4】 特性可変領域が、発光オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) のグリーン蛍光タンパク (GFP) を構成する RSGFP と BSGFP とからなることを特徴とする、請求項3記載のモニター蛋白質。

【請求項5】 リン酸化領域が配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなる、請求項1～4のいずれかに記載のモニター蛋白質。

【請求項6】 請求項1～5のいずれかに記載のモニター蛋白質をコードする核酸。

【請求項7】 請求項6に記載の核酸を担持する発現ベクター。

【請求項8】 請求項1～5に記載のモニター蛋白質、請求項6記載の核酸または請求項7記載の発現ベクターのいずれかをある特定の細胞に導入することにより、該細胞のリン酸化能を測定する方法。

【請求項9】 被験蛋白質と請求項1～5のいずれかに記載のモニター蛋白質とを反応させ、該モニター蛋白質の特性変化を測定する工程を含む、被験蛋白質のリン酸化能を測定する方法。

【請求項10】 (1) 被験蛋白質と請求項1～5のいずれかに記載のモニター蛋白質とを反応させる工程、

(2) 該モニター蛋白質の特性変化を測定する工程、

(3) 該モニター蛋白質の特性を変化させた被験蛋白質を選択する工程、を含む、リン酸化酵素をスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】

本発明は、タンパク質をリン酸化する活性を測定するための蛋白質及びこれをコードする核酸に関する。

【0001】

【従来の技術】

生物の生体内には巧みなスイッチ機構が存在し、このスイッチ機構により分化発生、防御反応、代謝活動等が制御されている。このスイッチ機構の一つとして蛋白質のリン酸化という現象が知られている (Hunter T., 1991, *Methods Enzymol.* 200: 3-37)。このリン酸化は酵素の介在により行なわれているものである。すなわちこの酵素は基質蛋白質にリン酸基を導入して、この基質蛋白質を活性化する。ここで活性化された基質蛋白質は、遺伝子の発現調節や細胞の増殖等、種々の反応を誘導する。

【0002】

近年、細胞のシグナル伝達と呼ばれる細胞の発生分化等を含めた種々の生体内の反応の基礎となるカスケード機構が明らかにされつつある。この細胞のシグナル伝達経路において、上記リン酸化反応が該経路のオンオフを決定するスイッチ機構の一つとして重要な機能を果たすことが示されている (Hunter T., 1995, *Cell* 80: 225-236)。

【0003】

現在までの研究において、シグナル伝達経路には複数の経路が存在することが示されている。例えば、ホルモンなどのように直接細胞膜を通過して細胞外の情報を細胞内に伝達する比較的単純な経路もこのシグナル伝達経路の一つであるが、近年では、複数の分子が相互に連絡して一定の情報を細胞内に伝える複雑な経路も発見されている。

【0004】

その一例として、G蛋白質を介したシグナル伝達の経路がある (Gilman, A.G.

, 1987, Annu. Rev. Biochem. 56: 615-649)。この経路においては、細胞膜上に形成されている受容体に特定の物質が結合することが伝達経路を始動させる信号となる。一方、細胞内で受容体と共役しているG蛋白質が、セカンドメッセンジャーであるcAMPの細胞内濃度を上昇させる。このcAMP濃度の上昇を利用してある特定のリン酸化酵素がAキナーゼをリン酸化する。このようにして生じたAキナーゼのリン酸化すなわち活性化が核などに信号として伝達されて、カスケード反応の最終ステージにおける生体反応に必要な蛋白などの発現が誘導されるものと考えられている。このG蛋白質を介したシグナル伝達の経路以外には、細胞表面の受容体及びMAPキナーゼに基く伝達経路 (Madhani, H.D. et al., 1998, Trends Genet. 14: 151-155) や、細胞膜のリン脂質及びCキナーゼに基く伝達経路 (Weinstein, I.B. et al., 1997, Adv. Exp. Med. Biol. 400A: 313-321) 等が知られているが、いずれの場合も蛋白質のリン酸化が経路の活性化のスイッチとして重要な機能を果たしていることが示されている。しかしながら、現在知られているシグナル伝達経路は、細胞内に存在することが予想される多くの伝達経路のごく一部であることが種々の研究から示唆されている。

#### 【0005】

このようにシグナル伝達経路を解明することは、生命活動の種々のメカニズムを解明する上で重要となることから、さらに新たな伝達経路の探索や既に知られている伝達経路に関与する物質の探索及びその物質の機能解析が進められている。中でも、シグナル伝達のスイッチ機構として重要な機能を果たすリン酸化反応の解析およびこの反応を担う酵素の探索等に関する研究が広く行われている。

#### 【0006】

このような蛋白質のリン酸化反応を担う酵素の探索は、主として既存の蛋白質リン酸化酵素をコードする遺伝子との相同性を比較することによりなされてきた。例えば、チロシン残基をリン酸化するリン酸化酵素のファミリーでは、これらファミリーに共通する配列 (Hunter T. et al., 1984, Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res. 17: 443-455) が知られていることから、この共通配列に基いてプローブ等を設計しライブラリー等のスクリーニングを行うことによって、新たな酵素の探索が可能となる。このようにして新たに発見された

酵素が蛋白質リン酸化活性を有するか否かは、主として $^{32}\text{P}$  同位元素を用いたインビトロの解析系を用いて解析される (D. Grahame Hardie 編, 「タンパク質のリン酸化: 実践的アプローチ (Protein Phosphorylation: A Practical Approach)」, 1993, Oxford University Press)。すなわち、探索した酵素、リン酸化領域を有する基質蛋白または既知のアミノ酸断片、および $^{32}\text{P}$  リン酸の三者を混合し、該基質蛋白又は該アミノ酸断片に $^{32}\text{P}$  が付加されるか否かを反応産物の放射能活性をモニターすることにより判定を行っている。

## 【0007】

しかしながら、従来の蛋白質リン酸化の解析法においては $^{32}\text{P}$  のような放射性同位体を用いることが必要であるため、実験設備等の制約があり、また、実験操作自体も慎重を期す必要があることから操作が煩雑となっていた。また、このような実験は放射性同位元素の廃棄物を伴うので、自然環境的にも好ましいとは言えなかった。さらには、上記の解析法では細胞内の活性そのものを測定することはできず、人工的に作られた環境下での測定結果しか得られないという問題があった。

## 【0008】

こうしたインビトロの解析系の問題を解消するために、インビボの測定系も開発されている。この方法は、直接リン酸化を測定するものではなく、リン酸化により誘導された細胞増殖を指標として蛋白質リン酸化反応を測定するものである。より具体的には、この解析系は細胞内への $^3\text{H}$ -チミジンの取り込み量から細胞増殖率を測定し、この細胞増殖率に基いてシグナル伝達経路の初期のリン酸化反応を測定しようとするものである。しかし、この方法においては、伝達経路の末端の活性、すなわち細胞増殖を指標として測定を行うため、リン酸化反応を迅速に測定することは困難である。また、リン酸化反応が生じるタイミング等を測定するには適した方法とはいえない。

## 【0009】

一方、最近の報告では、生体内のカルシウム濃度を測定する解析系が報告されている (Miyawaki, A. et al., 1997, Nature 388: 882-887)。この系は、カルモジュリン蛋白質の両端に発光オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) のグリー

ン蛍光蛋白質 (GFP) を融合させた融合蛋白質を用いて測定するものであり、この両端のGFP蛋白質が互いに接近し相互作用すると蛍光を発するという性質を利用したものである。すなわち、一定量のカルシウムが中央のカルモジュリン蛋白質に結合するとカルモジュリン蛋白質の立体構造が変化して、その両端のGFP蛋白質が相互作用により蛍光を発する。ここで発する光を測定することにより生体内のカルシウムの濃度を測定するという仕組みである。このようにカルシウム濃度の測定については、放射性同位体を使用せず、かつ、インビボの測定にも適用可能な優れた系が開発されているが、上述した蛋白質リン酸化反応についてはこのような系の開発が遅れている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明が解決しようとする課題は、放射性同位体を使用せず、かつ、インビボの測定にも適用可能な蛋白質リン酸化の解析系を樹立することである。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らはまず、リン酸化を受けることがすでに知られているアミノ酸配列の代表例として、CREBリン酸化配列 (Gonzalez, G.A. et al., 1989, Cell 59: 675-680) およびケンプタイドリリン酸化配列 (Kemp B.E. et al., 1977, J. Biol. Chem. 252: 4888-4894) をそれぞれコードする遺伝子を取得し、それぞれの遺伝子をプラスミドpETIC (Romoser V.A. et al., 1997, J. Biol. Chem. 272: 13270-13274) のRSGFP部位 (RGFPとも呼ばれる) とBSGFP部位 (BGFPとも呼ばれる) の間に挿入することによりプラスミドpETIC-CREBおよびpETIC-kemptideを作製した。両プラスミドともに「RSGFP-蛋白質リン酸化配列-BSGFP」なる構成を有する融合蛋白質を発現しうるプラスミドであり、蛋白質リン酸化配列のみが異なっている。また、リン酸化反応試験における陰性対照として、pETIC-1を用いた。本プラスミドは、「RSGFP-カルモジュリン結合部位-BSGFP」なる構成を有する融合蛋白質を発現しうるプラスミド (Romoser V.A. et al., J. Biol. Chem., 1997, 272: 13270-13274) である。

大腸菌BL-21 (DE3) をpETIC-CREB、pETIC-kemptideまたはpETIC-1を用いて形質



転換し、培養後細胞内の菌体より上記融合蛋白質を抽出した。

【0012】

$^{32}\text{P}$  同位元素を用いたインビトロの解析系を用いて解析したところ、pETIC-CR EBおよびpETIC-kemptideに由来する融合蛋白質はリン酸化を受けたが、pETIC-1 に由来する融合蛋白質はリン酸化を受けなかった。

【0013】

一方、 $^{32}\text{P}$  同位元素を用いずに非放射性のリン酸を基質として反応を行った場合に蛍光変化が生じるかどうかを検討した。その結果、pETIC-CREBに由来する融合蛋白質はリン酸化反応の有無によって吸収波長の変化が観察されたが、pETIC-kemptideまたはpETIC-1に由来する融合蛋白質は、リン酸化反応の有無によって吸収波長の変化が観察されなかった。この結果より、次の2つのことが明らかとなった。

1. pETIC-CREBに由来する融合蛋白質は、リン酸化を受けることにより、GFPの蛍光変化を惹起するために必要な蛋白質立体構造変化を生じる。
2. pETIC-kemptideに由来する融合蛋白質は、リン酸化を受けるが、それによって、GFPの蛍光変化を惹起するために必要な蛋白質立体構造変化を生じることはない。

【0014】

すなわち、本発明者らは蛋白質のリン酸化が蛋白質の立体構造変化を惹起する場合があることを示した。上記に示した二種のGFP蛋白質の組み合わせは、立体構造変化を特性変化として捕らえるための一例であり、他の特性を有する蛋白質等でも同様の系の構築が可能であることは自明である。

【0015】

したがって、特性変化を捕らえる領域、すなわち特性可変領域とリン酸化を受ける領域すなわちリン酸化領域とが融合した蛋白質を、蛋白質のリン酸化をモニターする蛋白質（モニター蛋白質）として使用することが可能となった。この場合、放射性同位体を使用する必要はなく、かつ、インビボの測定にも適用可能である。

このようなモニター蛋白質は、蛋白質のリン酸化反応を容易にモニターできる

ことより、新しいリン酸化酵素のスクリーニング方法として利用することができる。

【0016】

なお、蛋白質リン酸化酵素には、立体構造変化を生じるものと生じないものと二種類あることが示されたことより、既存の<sup>32</sup>P同位元素を用いたインビトロの解析系とモニター蛋白質の特性変化を利用した方法とを併用することにより、蛋白質のリン酸化が立体構造変化を惹起するかどうかを判定することも可能となった。すなわち本発明は、特許請求の範囲に記載の各請求項の発明を含む。

【0017】

【発明の実施の形態】

以下本発明を具体的に説明する。

1. 蛋白質のリン酸化を測定するためのモニター蛋白質

リン酸化を測定するためのモニター蛋白質（以下、モニター蛋白質）は、「リン酸化領域」と1または複数の「特性可変領域」とを含む蛋白質である。

ここで「リン酸化領域」は、リン酸化を受けるアミノ酸残基を含み該アミノ酸残基がリン酸化を受けることにより立体構造が変化するものをいい、以下に示すリン酸化を受けることが知られている蛋白質のうち、リン酸化により立体構造変化するリン酸化を受けることが示しうるものを用いることができる。リン酸化を受ける蛋白質としては、CREB転写因子 (Hagiwara, M. et al., 1993, Mol. Cell. Biol. 13:4852-4859)、ATF1 (Shimomura, A et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 17957-17960) 等が挙げられる。

【0018】

例えば、通常ではリン酸化によって立体構造の変化を起こさない蛋白質でも、モニター蛋白質にリン酸基特異的抗体を含めることによって、立体構造の変化を誘起することができると考えられる。よって、リン酸基特異的抗体と他の特性可変領域を組み合わせることも可能である。

【0019】

また、リン酸化領域は蛋白質の全長を用いてもよいが、リン酸化を受けるアミノ酸残基を含む一部配列でも好適に使用することができる。例えば、CREB転写因

子の場合には、133残基目のセリンがプロテインキナーゼAによるリン酸化の基質となることが知られており、この133残基目のセリンを含みリン酸化受ける配列であればその一部配列であってもよく、例えば、この一部配列としては配列番号：1に記載されたアミノ酸配列を選択することができる。また、この「リン酸化を受けるアミノ酸残基」としては、セリンの他にチロシン、スレオニン等が挙げられる。

#### 【0020】

「特性可変領域」は、蛋白質がリン酸化を受けたことが容易に判定できるものであれば、いかなるアミノ酸配列であっても構わない。GFP等を例示することができる。

「特性可変領域」は、リン酸化領域と融合蛋白質を形成していれば分散して存在していても構わない。リン酸化領域を挟んで設けられた「測定蛋白対」としてモニター蛋白質を構成することも好適である。すなわち、リン酸化領域内のアミノ酸残基はリン酸化を受けることによりリン酸化領域の立体構造が変化して、両側に設けられた測定蛋白対が相互作用して測定可能な特性を示すことを特徴とする。従って、例えば各構成を以下のように設定することも可能である。

前記リン酸化領域を挟んで設けられる「測定蛋白対」は、前記リン酸化領域の立体構造変化により互いに相互作用をして測定可能な特性を示すものであればいかなるものをも用いることができるが、例えば、発光オワンクラゲのBSGFP及びRSGFPのように相互作用して蛍光を発光するものなどを好適に使用することができる。

#### 【0021】

モニター蛋白質には、上記「リン酸化領域」及び「特性可変領域」以外に所望の機能領域を付加することもできる。例えば、核内でのリン酸化を測定するために測定体を核に運ばせる核移行シグナル (Goldfarb, D.S. et al., 1986, Nature 322: 641-644) や測定体を細胞に導入する際の指標となるマーカー (Heim, R. et al., 1995, Nature 373: 663-664) 等である。

#### 【0022】

### 2. モニター蛋白質の生成

上記リン酸化測定体の生成方法は特に限定はないが、例えば、モニター蛋白質をコードする核酸を大腸菌等の任意の宿主細胞内で発現させることにより生成することができる。すなわち、この「モニター蛋白質をコードする核酸」は、前記特性可変領域をコードする塩基配列とリン酸化領域をコードする塩基配列とを讀み枠が一致するように接続し、これら測定蛋白対とリン酸化領域とが融合蛋白質として発現し得るように構築する。ここで構築されたモニター蛋白質をコードする核酸を任意のベクターに接続し、適当な宿主細胞内に導入、発現させることにより増幅生成させることができる。ここで生成されたモニター蛋白質は、直接、好ましくは単離精製した後、インビトロ又はインビボのリン酸化の測定に用いることができる。

【0023】

尚、モニター蛋白質の生成に使用する際のベクター及び宿主細胞の組合わせには特に限定はないが、モニター蛋白質の発現を高めるためには発現活性の高いプロモータの下流に接続させることもできる。こうしたプロモータ等は、既知のプロモータから任意に選定し使用することができる。

【0024】

3. モニター蛋白質をコードする核酸

上記「モニター蛋白質をコードする核酸」は、モニター蛋白質をコードしていれば、その他の配列を有するものも含まれる。その他の配列としては、モニター蛋白質を細胞内で効率的に発現させる配列、例えば、プロモータ、エンハンサのような制御配列等、または細胞内に該核酸が導入されたことを検出するための薬剤耐性マーカー等の選択遺伝子等が含まれる。

【0025】

この核酸は、上述したモニター蛋白質を生成する目的で使用する事ができる以外に、細胞内に導入し直接モニター蛋白質を発現させて細胞内のリン酸化反応を直接検出する目的にも用いることができる。一般に蛋白に比べ核酸の形態のほう、細胞内への導入効率は高いことから、核酸として細胞内に上記モニター蛋白質をコードする核酸を用いることにより、前記モニター蛋白質の細胞内への運搬効率を高めることができる。また、後述する通り、前記核酸をベクターに担持

させることにより細胞内への運搬、核酸の調製を容易にすることができる。

【0026】

4. モニター蛋白質をコードする核酸を担持するベクター

ベクターは、特に限定はなく、自己複製可能な転写開始配列を含むものであれば大腸菌、酵母、植物細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞などにおいて発現可能な公知のプラスミドを用いることができる。従って、これら公知のプラスミドの中から試験対照とする細胞等に対応して適宜選択して使用することができる。

【0027】

5. リン酸化酵素をスクリーニングするためのモニター蛋白質

モニター蛋白質は、該モニター蛋白質のリン酸化領域をリン酸化する酵素の検索やスクリーニングに用いることもできる。所望のリン酸化領域を有するモニター蛋白質を、インビボまたはインビトロで被検蛋白質に作用させ、モニター蛋白質のリン酸化を検出することによって、該リン酸化領域をリン酸化する酵素をスクリーニングすることができる。インビボでスクリーニングを行う場合は、モニター蛋白質をコードする核酸を担持するベクターを用いることができる。被検蛋白質としては特に制限はない。天然の蛋白質ライブラリー、人工蛋白質ライブラリー、またはそれらのcDNAライブラリーなどを使用することができる。また、リボザイムライブラリー等も使用できる。

【0028】

【実施例】

以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

尚、この実施例では、リン酸化領域としてCREB転写因子のリン酸化配列（以下、CREBリン酸化配列という）を用い、また、測定蛋白対として発光オワンクラゲのRSGFPとBSGFPとを用いてモニター蛋白質を構築し、リン酸化の検出を行った。なお、CREBリン酸化配列を配列番号：1に示した。

また、CREBリン酸化配列に代えてケンプタイド（kemptide）のリン酸化配列（配列番号：2）を用いたモニター蛋白質も同時に構築し、上記CREBリン酸化配列を保持するモニター蛋白質との比較を行った。

【0029】

〔実施例1〕 リン酸化配列をコードするDNA断片の合成

先ず、上記モニター蛋白質を構築するために、リン酸化配列をコードするDNA断片を合成した。CREBリン酸化配列をコードするDNA断片（以下CREB-DNA断片という）は、オリゴヌクレオチドLCR-1B（配列番号：3）を鋳型とし、また、プライマーとしてPCR-1K（配列番号：5）及びPCR-1A（配列番号：6）を用いてPCRにより増幅し合成した。

また、対照として用いるケンプタイドのリン酸化配列をコードするDNA断片（ケンプタイド-DNA断片という）は、オリゴヌクレオチドLKe-1B（配列番号：4）を鋳型とし、また、プライマーとしてPKe-1K（配列番号：7）及びPKe-1A（配列番号：8）のプライマーセットを用いて同様にPCRにより増幅し合成した。PCR反応の詳細な操作は次の通り行った。

【0030】

PCR反応液をマイクロチューブ（0.2ml用）に調製した。PCR反応液の組成は、滅菌水（18.3 $\mu$ l）、10 $\times$ EXTaqバッファ（2.5 $\mu$ l）、dNTP混合液（2.0 $\mu$ l）、EXTaqポリメラーゼ（0.2 $\mu$ l）（宝酒造）、鋳型オリゴヌクレオチド（20 nmol/ml）（1.0 $\mu$ l）、プライマー（約50nmol/ml）（各0.5 $\mu$ l）とした。

上記各反応液を含むマイクロチューブをDNA増幅器（GeneAmp PCR System 2400、パーキンエルマージャパン株式会社）にセットしてPCR反応を実行した。PCR反応は、次の条件で行った。PCR反応は、変性工程（94 $^{\circ}$ C、30秒）を1サイクル行った後、変性工程（94 $^{\circ}$ C、50秒）、アニーリング工程（57 $^{\circ}$ C、1分）及び伸長工程（72 $^{\circ}$ C、1分）の一連工程を40サイクル実行し、最終的に伸長工程（72 $^{\circ}$ C、7分）を行った後、4 $^{\circ}$ Cに冷却した。

【0031】

PCR反応終了後、電気泳動により増幅断片の確認のため電気泳動を行った。電気泳動を行うために反応液の一部（10 $\mu$ l）を分取し、この反応液に電気泳動用バッファを混合した。この混合液を10%アガロースゲル上で分画し、分画後のアガロースゲルをエチジウムブロマイド染色法により、目的の断片を確認した。目的の断片を剃刀等で切り出し、それぞれマイクロチューブ（1.5ml用）に移

し、GenecleanIIIキット（BIO 101社）を用いて各断片を回収した。回収した各DNAはトリスEDTA緩衝液（TE）（ $100\mu\text{l}$ ）に溶解し、精製した。精製は、次の操作により行った。まず、溶解液にフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）を加えて攪拌した。静置後、上清を除去して、エタノール沈殿を行った。上清を除去し、沈さを滅菌水を用いて溶解した。

#### 【0032】

##### 【実施例2】 モニター蛋白質遺伝子を担持するプラスミドの構築

上記各DNA断片を図1に示すpETICベクター（J.Biol.Chem., 272: 13270-13274, 1997）に挿入した。このpETICベクターは、既に測定蛋白対としてRSGFP遺伝子及びBSGFP遺伝子が担持されていることから、これらRSGFP遺伝子とBSGFP遺伝子との間に上記DNA断片を挿入することにより、「RSGFP遺伝子-リン酸化配列-BSGFP遺伝子」が配列されたモニター蛋白質遺伝子が構築される。

#### 【0033】

まず、pETICベクター及び上記2つのDNA断片を常法に従い制限酵素KpnI、AgeIにより切断した。切断後、10%アガロースゲルを用いて、各断片及び直鎖状としたベクターを電気泳動により分画した。分画後、それぞれ目的の断片を上記と同様にGenecleanIIIキットにより回収し、精製した。これら切断片は、それぞれTEバッファー（ $10\mu\text{l}$ ）に溶解した。

次に、上記溶解液を用い、pETICベクターにCREB-DNA断片又はケンプタイド-DNA断片をライゲーションにより接続した。ライゲーションはDNA Ligaton Kit Ver. 2（宝酒造株式会社）を用いて行った。

CREB断片液（ $5\mu\text{l}$ ）に直鎖状としたpETICベクター液（ $3\mu\text{l}$ ）を混合し、これに上記キットのI液（ $8\mu\text{l}$ ）を添加し、 $16^{\circ}\text{C}$ 、30分間反応させた。ケンプタイド断片液（ $5\mu\text{l}$ ）も同様にpETICベクター液（ $3\mu\text{l}$ ）及び上記キットのI液（ $8\mu\text{l}$ ）を混合して、ライゲーション反応を実行した。また、これ以外にも挿入断片に代えてTEバッファーのみのライゲーションサンプルも調製した。

#### 【0034】

上記ライゲーション反応液から目的のプラスミドを回収するために、上記ライゲーション反応液（ $8\mu\text{l}$ ）をJM109コンピテントセル（ $100\mu\text{l}$ ）と混合し、形質

転換を行った。形質転換は、常法に従って行った。形質転換後のJM109をカナマイシンを含有する寒天培地にひろげ、37℃で一晩培養した。培養後、生育したカナマイシン耐性コロニーをかきとり、細胞内のプラスミドを解析した。この解析により、pETICベクターに目的の断片が挿入されているプラスミドを保持する細胞を選択し、これら細胞からプラスミドを調製した。なお、ここで調製されたプラスミドのうち、CREB断片が挿入されているプラスミドを「pETIC-CREB」とし、ケンプタイド断片が挿入されているプラスミドを「pETIC-kemptide」とした。

## 【0035】

## 【実施例3】 モニター蛋白質の生成

上記「pETIC-CREB」「pETIC-kemptide」を用いて、それぞれCREB由来又はケンプタイド由来のリン酸化配列を含むモニター蛋白質の生成を行った。なお、これらプラスミドのベクターであるpETICベクターは、pET30aベクター（Novagen社）を基に作製されたものであり、このpET30aベクターの有する機能を保持している。すなわち、このpETICベクターは、インサート領域の上流にT7プロモータが備えられ、BL21(DE3)のような、lacUV5プロモータの下流にT7RNAポリメラーゼ遺伝子を保持する大腸菌内でIPTGにより目的蛋白質を発現誘導することができる。また、ここで発現した組換え蛋白質には、ヒスチジンの標識（His-tag）が付加されるためNiアガロースにより容易に回収することが可能となる。従って、このpETIC-CREB、pETIC-kemptideを用いてモニター蛋白質の生成は上記原理に基いて、次の通り行った。

## 【0036】

上記pETIC-CREB、pETIC-kemptideをそれぞれ上記と同様の方法によりBL21(DE3)コンピテントセルへ形質転換した。形質転換後、カナマイシン含有寒天培地上の形成されたコロニーをかきとり、3mlのLB培地（カナマイシン50 $\mu$ g/ml）に植菌し、37℃で一晩培養し、前培養液を調製した。この前培養液（2ml）を同様のLB培地500mlを含む2Lフラスコに移し、37℃で吸光度（600nm）が0.6となるまで培養した。吸光度（600nm）が0.6となったところでIPTGを1mMとなるように添加し、23℃でさらに一夜培養した。

## 【0037】



培養液を遠心分離(5000rpm、10分間、4℃)を行い、細胞を回収した。回収した細胞をバッファー(50mMトリス塩酸(pH7.5)、150mM NaCl、2mMベンズアミジン、1mM PMSF) 10 mlに懸濁した。懸濁液を氷上にて30秒パルスで5回超音波破碎を行った。破碎液にNP-40、イミダゾールをそれぞれ最終濃度0.1%、20 mMとなるように添加し、その後、破碎液を4℃にて攪拌器を用いて攪拌した。攪拌後、4℃にて遠心分離(10,000rpm、10分)を行い、上清を回収した。

回収した上清にNi-NTA-アガロース(キアゲン社)を500  $\mu$ l添加して、4℃にて攪拌器により60分間攪拌した。攪拌後、上記Ni-NTA-アガロースを2 mlのバインディングバッファー(50 mMトリス塩酸(pH7.5)、150 mM NaCl、2 mM ベンズアミジン、1 mM PMSF、0.1% NP-40、20 mM イミダゾール)により4回洗浄した。

洗浄後、1 ml溶出バッファー(50mMトリス塩酸(pH 7.5)、150mM NaCl、2mMベンズアミジン、1mM PMSF、0.1%NP-40、200mM イミダゾール)を加えて、4℃にて攪拌器を用いて30分間攪拌した。攪拌後、遠心分離を行い、上清を回収した。この一連の溶出操作を2回繰り返した。ここで回収された溶出液を最終濃度20%となるようにグリセロールを添加し、-80℃下で保存した。

#### 【0038】

上記の方法で回収した溶出液10  $\mu$ lを10%アクリルアミドゲルにて電気泳動を行いモニター蛋白質を確認した。泳動後のゲルをクマシーブリリアントブルー(CBB)を用いて染色した結果を図2に示す。なお、図2において、pETIC-1(Romeser, V.A.ら、J.Biol.Chem.,272:13270-13274)はpETICベクターにCa<sup>2+</sup>カルモジュリン結合部位をコードする配列が組み込まれたものであり、組換え蛋白質(RSGFP-カルモジュリン結合部位-BSGFP)の調製において陽性対照として用いた。また、「IPTG-」は培養時にIPTGによる誘導を行わなかったもの、「IPTG+」は培養時にIPTGによる誘導を行なったものを示す。

#### 【0039】

図2に示す通り、IPTGによる発現誘導を行った場合に「pETIC-CREB」「pETIC-Kenmtide」においてそれぞれ単一のバンドとして示される蛋白質が検出された。これら蛋白質は、陽性対照であるpETIC-1より発現される蛋白とほぼ同等のサイズを有していることから、ここで発現されている蛋白質が目的のモニター蛋白質

、すなわち、RSGFP-CREBリン酸化配列-BSGFP、RSGFP-ケンプタイドリン酸化配列-BSGFPが生成されていることが予想された。

【0040】

〔実施例4〕  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ を用いたリン酸化の測定

本実施例では、インビトロ系において上記2つのモニター蛋白質のリン酸化配列がリン酸化を受けるかを確認した。この確認試験は、リン酸化酵素としてAキナーゼを、また、基質として  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATPを用いて、以下の操作により実施した。

【0041】

反応液を調製するために、10×キナーゼバッファ (250mM Hepes pH7.5、100 mM  $\text{MgCl}_2$ 、10mM DTT) ( $5\mu\text{l}$ )、Aキナーゼ ( $1\mu\text{l}$ )、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP ( $0.5\mu\text{l}$ )、滅菌水 ( $43\mu\text{l}$ ) を加え混合した。この混合液に各モニター蛋白質の含有する溶出水 ( $0.5\mu\text{l}$ ) をそれぞれ添加した。添加後、反応液を30℃にて90分保温することによりリン酸化反応を実行させた。

反応後、各モニター蛋白質がリン酸化されているか否かを電気泳動により確認した。電気泳動の前処理として、反応後の反応液 ( $50\mu\text{l}$ ) に2×サンプルバッファ ( $50\mu\text{l}$ ) を添加し3分間煮沸した。煮沸後の液 ( $20\mu\text{l}$ ) を用い10%アクリルアミドゲルにより電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルをフィルムに感光させ、 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ のシグナルを検出した (図3)。

【0042】

図3に示す通り、「pETIC-CREB」由来のモニター蛋白質及び「pETIC-kemptide」由来のモニター蛋白質において、いずれもシグナルが検出された。また、このシグナルが特異的であることは、リン酸化配列を保持していないpETIC-1由来蛋白質においてシグナルが検出されないことから明らかである。また、「pETIC-CREB」及び「pETIC-kemptide」において検出されたシグナルの位置は、図2に示すこれらプラスミドが発現するモニター蛋白質のサイズともそれぞれ一致していた。これらの結果より、実施例3において生成された2つのモニター蛋白質はリン酸化配列を保持し、この配列がリン酸化を受けることが確認された。

【0043】

### 【実施例 5】 蛍光変化によるリン酸化の測定

上記 2 つのモニター蛋白質は、リン酸化配列の一方に RSGFP が、他方に BSGFP が接続されている。これら 2 つのモニター蛋白質におけるリン酸化配列がリン酸化を受けることにより両側の RSGFP と BSGFP とが相互干渉して蛍光変化が生じるかを検討した。

#### 【0044】

反応液として、 $10\times$ キナーゼバッファ ( $20\mu\text{l}$ )、ATP ( $100\text{mM}$ ) ( $2\mu\text{l}$ )、滅菌水 ( $168\mu\text{l}$ ) を混合し、この混合液に上記モニター蛋白質 ( $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ( $10\mu\text{l}$ ) を添加した。さらに、この反応液に A キナーゼを添加量を変えて 0、1、2 又は  $4\mu\text{l}$  添加した。

調製された反応液を  $30^\circ\text{C}$  にて 30 分間保温した。保温後の反応液を蛍光分光光度計 (日本分光株式会社) により波長域  $430\sim 520\text{nm}$  の範囲における吸収する波長域の変化を測定した。CREB モニター蛋白質 (pETIC-CREB 由来)、ケンプタイドモニター蛋白質 (pETIC-kemptide 由来)、および陰性対照である pETIC-1 由来の組換え蛋白質における蛍光変化の結果を、それぞれ合う 4、5、および 6 に示す。また、上記において A キナーゼの添加量の相違は、グラフ線を異ならして表現した。

#### 【0045】

図 4 に示す通り、CREB モニター蛋白質については、A キナーゼの非添加の吸収パターンと添加した場合の吸収パターンとの間に差が観られた。A キナーゼ非添加の場合には、 $500\text{nm}$  においてより強い吸収が観られるが、A キナーゼの添加量を増加させるに従って、 $450\text{nm}$  における吸収が増強された。このことから CREB リン酸化配列は、リン酸化を受けることにより立体構造の変化が生じ、これによってその両側の RSGFP と BSGFP との相互干渉が可能となり、蛍光が発光されていることが示された。

#### 【0046】

一方、ケンプタイドモニター蛋白質 (図 5) については、上記実施例 3 における  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP を用いたリン酸化測定ではリン酸化が確認されているにもかかわらず、蛍光変化に関しては陰性対照 (図 6) と同様に上述したような波長域の

変化は観察されなかった。このことからケンプタイドのリン酸化配列はリン酸化されるが、その際に立体構造の変化を伴わないことが予想された。

【0047】

以上の通り、上記CREBモニター蛋白質は、上述した蛍光変化を指標として、リン酸化反応の検出等に利用することができることが明らかになった。従って、このCREBモニター蛋白質を発現するpETIC-CREBを細胞内に導入することによりインビボ系の構築も可能となる。また、上記CREBモニター蛋白質は、単にリン酸化反応の検出のみならず、リン酸化酵素の検索にも利用することができる。

【0048】

一方、ここではCREBリン酸化配列とケンプタイドリン酸化配列とではリン酸化された際の構造変化の有無という点で相違することが示された。このことは、RSGFP及びBSGFPは、リン酸化された際のリン酸化配列の構造変化の解析に利用することができることを示している。すなわち、RSGFPとBSGFPとの間に任意のリン酸化配列を挿入し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATPを用いたリン酸化測定及び蛍光変化に基づくリン酸化測定の双方を実施し、これら結果によりリン酸化を受けた際の構造変化を観察することができることをも示された。

【0049】

【発明の効果】

本発明によって、放射性同位体を使用せず、かつ、インビボの測定にも適用可能な蛋白質リン酸化の解析系が開発された。本発明の解析系は、単にリン酸化反応の検出のみならず、リン酸化酵素の検索にも利用することができる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> HAGIWARA, Masatoshi

<110> INOUE, Satoshi

<110> NAGAI, Yasuo

<120> Monitor proteins for measurement of protein phosphorylation

<130> SEN-001

<160> 8

<210> 1

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: CREB phosphorylation region.

<400> 1

Thr Ser Ser Glu Ile Leu Ser Arg Arg Pro Ser Tyr Arg Lys Ile Leu

1

5

10

15

Asn Asp Leu Ser Ser Asp Thr

20

<210> 2

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Kemptide phosphorylation region.

<400> 2

Thr Ser Leu Arg Arg Ala Ser Leu Gly Thr Gly His Ala Val Arg Ala

1

5

10

15

Ile Gly Arg Leu Ser Ser Thr

20

<210> 3

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 'LCR-1B', a template for generation of CREB phosphorylation region.

<400> 3

ccggtatccg atgacagatc gttcaggatc ttgcgatatg atggacgtcg cgacaggatc 60

73

tctgatgagg tac

<210> 4

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 'LKe-1B', a template for generation of Kemptide phosphorylation region.

<400> 4

ccggtggacg acaatcgicc gatagcgcgt actgcgtgac cggttcctaa cgatgctcga 60  
cgcaatgagg tac 73

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 'PCR-1K', a PCR-primer for generation of CREB phosphorylation region.

<400> 5

tgctggtacc tcatcagaga tcc 23

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 'PCR-1A', a PCR-primer for generation of CREB phosphorylation region.

<400> 6

agcaccgcta tccgatgaca gat 23

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 'PKe-1K', a PCR-primer for generation of Kemptide phosphorylation region.

<400> 7

tgctggtacc tcattgcgtc gag

23

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 'PKe-1A', a PCR-primer for generation of Kemptide phosphorylation region.

<400> 8

atcacccggtg gacgacaatc gtc

23

【図面の簡単な説明】

【図 1】

pETICベクターの構造図である。

【図 2】

精製組換え蛋白質をSDS-PAGEで分離した後のCBB染色像である。

【図 3】



Aキナーゼによるリン酸化アッセイの結果を示す図である。

【図4】

CREBモニター蛋白質 (pETIC-CREB由来) の吸収波長のAキナーゼ添加による効果を示すグラフである。

【図5】

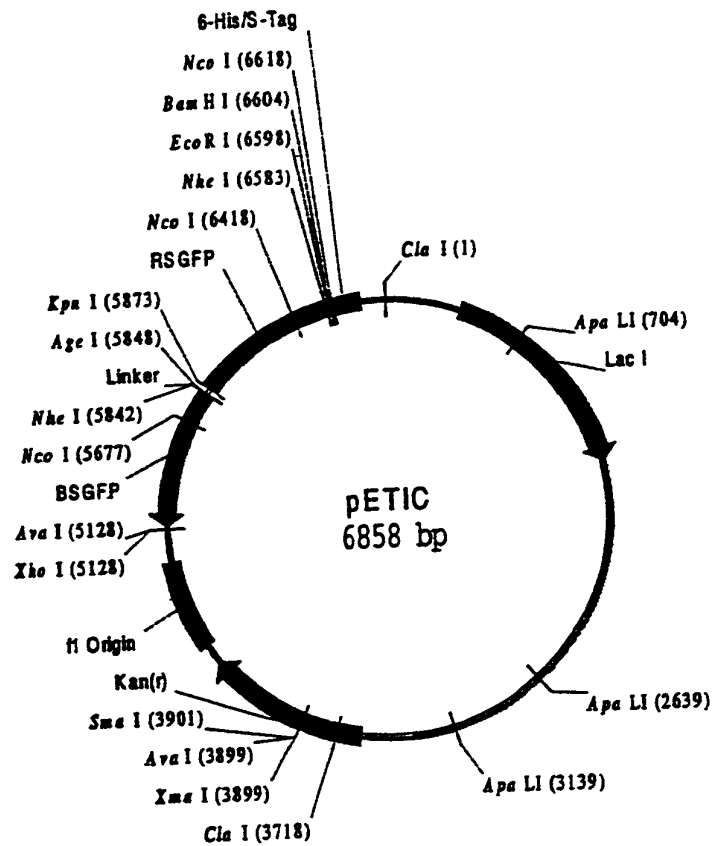
ケンプタイドモニター蛋白質 (pETIC-Kemptide由来) の吸収波長のAキナーゼ添加による効果を示すグラフである。

【図6】

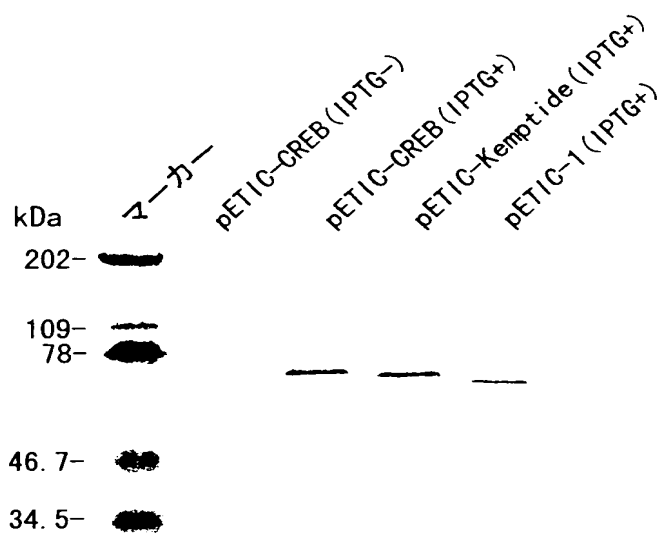
陰性対照蛋白質 (pETIC-1由来) の吸収波長のAキナーゼ添加による効果を示すグラフである。

【書類名】 図面

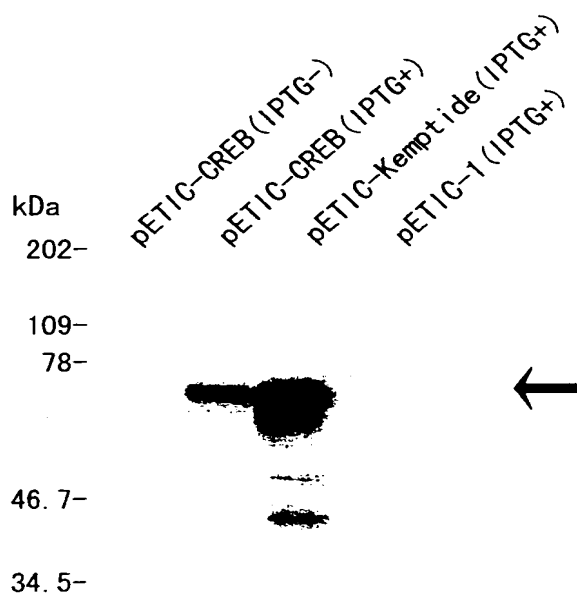
【図 1】



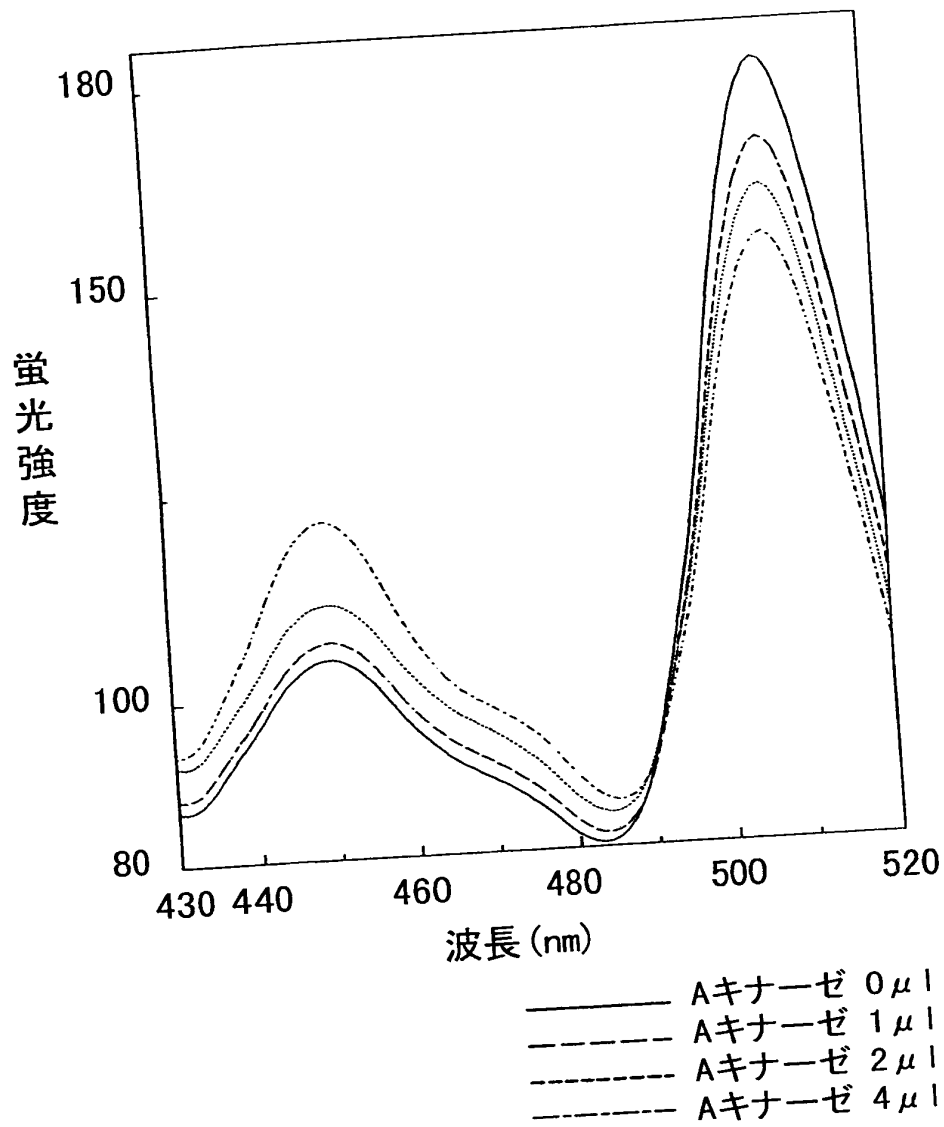
【図 2】



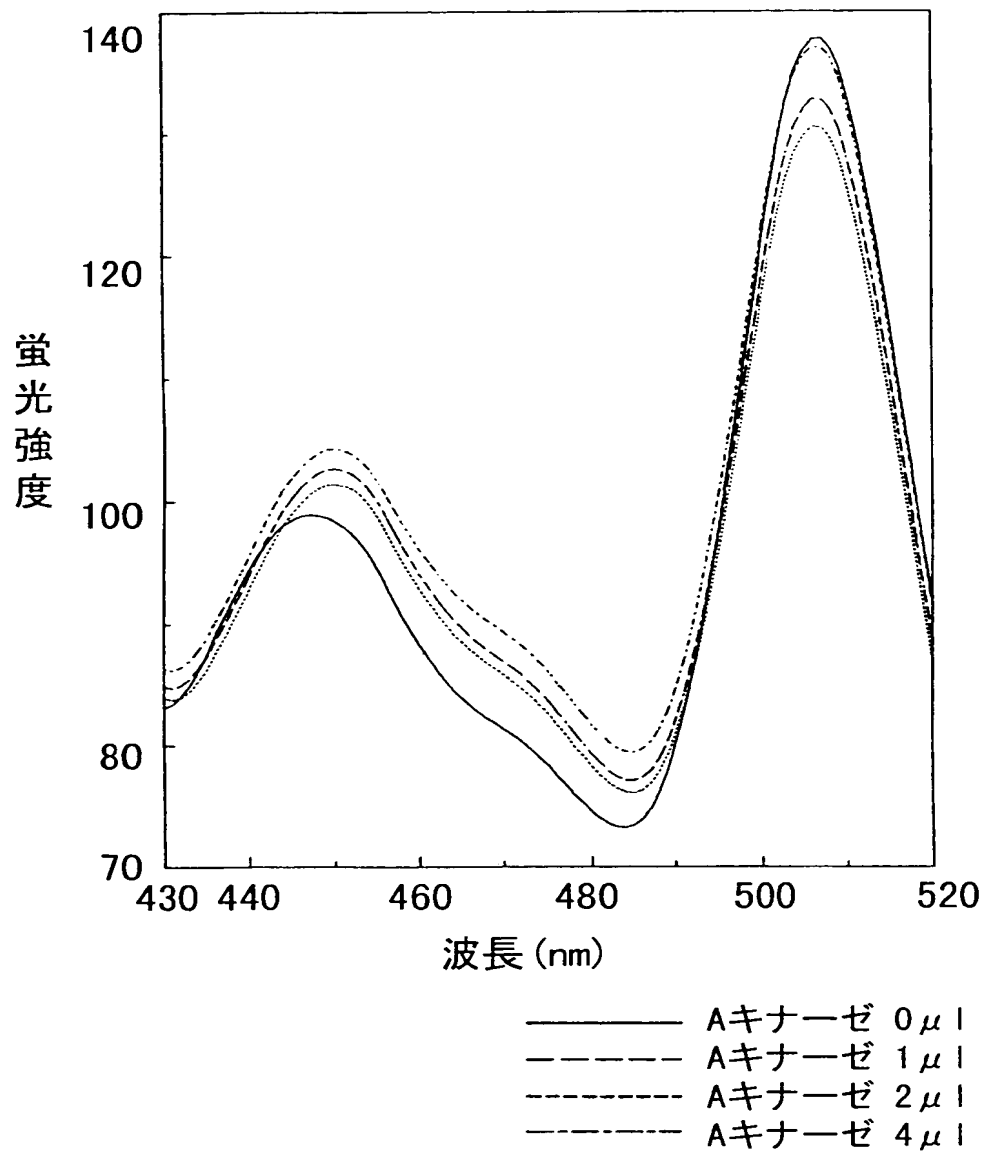
【図 3】



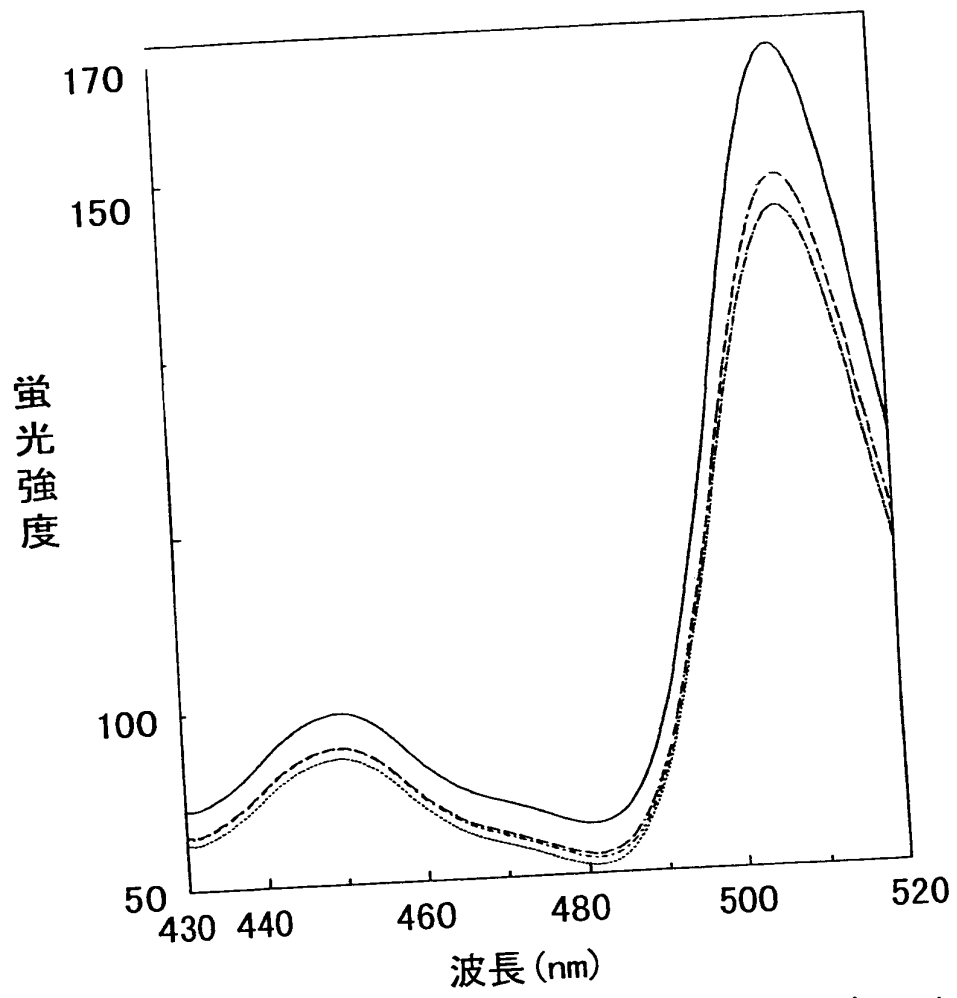
【図 4】



【図5】



【図 6】



— Aキナーゼ 0  $\mu$ l  
- - - Aキナーゼ 1  $\mu$ l  
- - - Aキナーゼ 2  $\mu$ l  
- - - Aキナーゼ 4  $\mu$ l

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、放射性同位体を使用せず、かつ、インビボの測定にも適用可能な蛋白質リン酸化の解析系を樹立することを課題とする。

【解決手段】 リン酸化領域と、立体構造の変化によって特性が変化する特性可変領域を含むタンパク質を用いて、該リン酸化領域のリン酸化を簡便にモニターすることができるリン酸化モニタータンパク質を作製することに成功した。本発明によって、放射性同位体を使用せず、かつ、インビボの測定にも適用可能な蛋白質リン酸化の解析系が開発された。本発明の解析系は、単にリン酸化反応の検出のみならず、リン酸化酵素の検索にも利用することができる。

【選択図】 なし

【書類名】  
【訂正書類】

職権訂正データ  
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

598120001

【住所又は居所】

東京都文京区湯島 1-5-45 東京医科歯科大学  
難治疾患研究所内

【氏名又は名称】

萩原 正敏

【特許出願人】

【識別番号】

598120012

【住所又は居所】

神奈川県横浜市金沢区大川 5-1 チッソ（株）横  
浜研究所内

【氏名又は名称】

井上 敏

【特許出願人】

【識別番号】

598120023

【住所又は居所】

東京都文京区湯島 1-5-45 東京医科歯科大学  
難治疾患研究所内

【氏名又は名称】

永井 康雄

【代理人】

申請人

【識別番号】

100102978

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階  
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】

100108774

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階  
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

橋本 一憲



【書類名】 出願人名義変更届

【整理番号】 CA5-013

【提出日】 平成11年 6月29日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成10年特許願第248861号

【承継人】

【識別番号】 598155287

【氏名又は名称】 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター

【承継人代理人】

【識別番号】 100112553

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 剛

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 079648

【納付金額】 4,600円

特平 10-248861

## 認定・付加情報

特許出願の番号	平成10年 特許願 第248861号
受付番号	59900622677
書類名	出願人名義変更届
担当官	宇留間 久雄 7277
作成日	平成11年 8月24日

### <認定情報・付加情報>

#### 【承継人】

##### 【識別番号】

598155287

##### 【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 新丸ノ内  
ビルディング6階

##### 【氏名又は名称】

株式会社 先端科学技術インキュベーションセン  
ター

#### 【承継人代理人】

申請人

##### 【識別番号】

100112553

##### 【住所又は居所】

東京都豊島区南池袋3丁目18番34号 池袋シ  
ティハイツ701 正林国際特許事務所

##### 【氏名又は名称】

中村 剛

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598120001]

1. 変更年月日 1998年 9月 2日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都文京区湯島 1 - 5 - 4 5 東京医科歯科大学 難治疾患  
研究所内

氏 名 萩原 正敏

特平10-248861

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[598120012]

1. 変更年月日 1998年 9月 2日

[変更理由] 新規登録

住 所

神奈川県横浜市金沢区大川5-1 チッソ(株)横浜研究所内

氏 名

井上 敏

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598120023]

1. 変更年月日	1998年 9月 2日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都文京区湯島1-5-45 東京医科歯科大学 難治疾患 研究所内
氏 名	永井 康雄

特平10-248861

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[598155287]

1. 変更年月日 1998年10月22日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都千代田区神田駿河台3丁目3番地4  
氏 名 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター
2. 変更年月日 1999年 7月28日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 新丸ノ内ビルディング6階  
氏 名 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター